remplace ex disparu

UTILISATION DU «DIPSTICK» A YAOUNDE

LE GOFF G.*, FONDJO E.**, GAZIN P.* & CARNEVALE P*.

1. Introduction

Le kit «Dipstick» permet l'identification de l'origine (humaine ou non humaine) des repas sanguins des culicidés. Il a été testé au laboratoire d'Entomologie Médicale de l'OCEAC (Yaoundé, Cameroun) afin d'apprécier sa spécificité et sa sensibilité dans différentes conditions de conservation des prélèvements.

2. Matériel

Moustiques: *Culex quinquefasciatus, Anopheles gambiae, An. nili, An. funestus* et également des moustiques d'élevage: *Aedes aegypti.*

Du sang humain a été utilisé pour tester la sensibilité, pour la spécificité, du sang d'animaux: poulet, lapin, singe. Poulets et lapins sont des animaux de laboratoire servant au gorgement de nos moustiques d'élevage. Le singe *(Cercopithecus aethiops)* appartient à l'animalerie du Centre Pasteur de Yaoundé.

Ainsi qu'il est recommandé dans le mode d'emploi du kit, les sérums ont été dilués au 1/201 dans le tampon prévu à cet effet.

3. Méthodes

Vingt prélèvements ont été testés à chaque séance, soit avec les témoins, 24 bandelettes par cuve.

- Témoins négatifs: pour chaque test, nous avons utilisé 3 mâles d'*A.aegypti.*

- Témoins positifs: 1 ou 2 par test; ce sont des *A.aegypti* femelles gorgées sur l'opérateur quelques instants avant le début de la manipulation.

- Lecture: la qualité de la réaction colorimétrique sur la pastille a été optiquement apprécié, et noté en 4 classes:
. le témoin négatif est noté (-)
. une réaction faiblement marquée est notée (+/-)
. une réaction d'une intensité moyenne est notée (+)
. une réaction intense et le témoin positif sont notés (++)

4. Résultats

4.1. Spécificité du «Dipstick»

4.1.1. Sang humain / sang de poulet et de lapin

Les femelles d'*A.aegypti* gorgées sur ces animaux de laboratoire ont été testées immédiatement après leur repas sanguin. La lecture s'est faite comparativement aux témoins positifs.

	Nb de tests	Lecture
POULET	15	(-)
LAPIN	5	(-)
TEMOIN POSITIF	5	(++)
TEMOIN NEGATIF	4	(-)

Aucune réaction positive n'a été observée avec le sang de poulet et de lapin: le kit est bien spécifique.

4.1.2. Sérum humain / sérum simien

Les sangs humain et simien ont été prélevés par ponction veineuse sur anticoagula (ACD). Les sérums ont été traités en les diluant au 1/201 dans le tampon, soit 2 µl de source antigène + 400 µl de tampon.

	Nb de tests réalisés	lecture
Sérum humain (tém. positif)	6	(++)
Sérum simien	7	(+/-)
Témoin négatif	4	(-)

L'apparition d'un halo légèrement coloré sur le pourtour de la pastille a été observé, avec le sérum du cercopithèque. Cette réaction est suffisamment différente de celle faite avec le sérum humain pour pouvoir les distinguer.

4.1.3. Sérum humain dilué dans du sérum de singe

Pour envisager la possibilité de repas mixtes, du sérum humain a été mélangé dans du sérum de singe à différentes dilutions.

	Nb de tests réalisés	lecture
Dilution 1/2	2	(++)
Dilution 1/10	4	(++)
Dilution 1/50	2	(++)
Dilution 1/100	2	(++)
tém. + (sérum humain)	6	(++)
tém. négatif	4	(-)

Même en diluant le sérum humain au centième, aucune différence d'intensité de la réaction colorée entre les différentes dilutions et le témoin positif n'a été observée.

4.2. Sensibilité du «Dipstick»

4.2.1. Sensibilité en fonction de la conservation des prélèvements

En vue d'une utilisation à plus grande échelle sur le terrain, il importait de savoir comment le «Dipstick» réagirait en fonction de différentes conditions de conservation des prélèvements, les exemples suivants ont été employés:

a) estomacs placés dans un tube sec et maintenus pendant 24 H. à l'étuve à 37° C.

b) estomacs écrasés sur papier filtre, sèchés sur silicagel et maintenus à l'étuve pendant 24 H.

c) estomacs écrasés sur papier filtre, sèchés sur silicagel et maintenus à l'étuve pendant 6 jours.

d) estomacs écrasés sur papier filtre, sèchés sur silicagel et maintenus à l'étuve pendant plus d'un mois.

e) spécimens de moustiques entiers conservés dans un tube à hémolyse, maintenus pendant 3 semaines à l'étuve.

f) spécimens de la faune résiduelle matinale capturés par la méthode du «spray» (bombe insecticide), et conservés dans un tube à hémolyse durant 4 jours à l'étuve.

g) estomacs placés dans un tube Eppendorf sec et conservés à 4°C pendant 24 H.

h) estomacs placés dans un tube Eppendorf sec et conservés à 4°C pendant 72 H.

i) estomacs placés dans un tube Eppendorf sec et conservés à 4°C pendant 8 jours.

* Service d'Entomologie médicale de l'OCEAC et Antenne ORSTOM de l'OCEAC
** Ministère de la Santé Publique du Cameroun

Conditions de conservation	Nb de tests réalisés	Lecture
a	20	(++)
b	8	(++)
c	8	(++)
d	20	(+)
e	10	(++)
f	6	(++)
g	13	(++)
h	21	(+)
i	12	(+)
Témoin positif	18	(++)
Témoin négatif	27	(-)

La réaction colorimétrique s'est correctement révélée quelques soient les différentes conditions de conservation des prélèvements.

Une très bonne réactivité du kit a été obtenue même avec du sang conservé plus d'un mois, mais il semble qu'au delà d'un mois de conservation à 37°C, la réaction devienne moins sensible (cas d). Aucune altération de la source antigénique n'a été observée lors de l'emploi de pyréthrinoïdes de synthèse comme moyen de capture des moustiques (cas f).

La conservation des estomacs dans des tubes secs au réfrigérateur diminue quelque peu l'intensité de la réaction colorée (cas h et i).

Il faut noter qu'à deux reprises le mauvais rinçage des pilons fournis avec le Kit a été à l'origine de faux-positifs. Il est d'ailleurs conseillé aux utilisateurs d'utiliser des pipettes Pasteur avec bout arrondi à la flamme.

4. 2. 2. Sensibilité en fonction de la digestion du repas sanguin.

Des femelles d'*A. aegypti* d'élevage ont été gorgées sur membrane avec du sang humain prélevé par ponction veineuse sur anticoagulant (ACD). Des lots de moustiques ont été tués 30, 36 et 42 heures après le repas de sang et analysés immédiatement.

Nombre d'heures après le repas sanguin.	Nb de tests réalisés	Lecture
30	8	(+)
36	3	(+/-)
42	3	(+/-)
Témoin positif	2	(++)
Témoin négatif	5	(-)

La réaction colorimétrique est encore appréciable 30 heures après le repas sanguin. Par contre, à partir de 36 heures de digestion on observe seulement une auréole faiblement colorée sur la pastille.

5. Discussion

L'analyse des résultats des repas sanguins pris sur homme ou sur animaux permet d'affirmer la bonne spécificité du «Dipstick».

Le Kit est efficace pour des techniques de conservation très diverses. Ceci permet de travailler en gardant le choix de la technique la mieux adaptée aux conditions de terrain.

En cas de digestion de sang humain inférieure à 30 heures, la réaction colorée est suffisamment nette pour permettre de la différencier du sang simien. Par contre, en cas de digestion supérieure à 30 heures et dans le cas des sérums de singe, la réponse colorimétrique est équivalente. Il n'est pas possible de les différencier, et ce type de réaction doit être considérée comme ininterprétable.

6. Conclusion

Le test «Dipstick» a une bonne spécificité et il est efficient pour des repas sanguins conservés selon divers protocoles. Il est facile à exécuter dans un laboratoire normalement équipé. Il satisfait donc à l'analyse des repas sanguins pour une première approche des préférences trophiques de la faune culicidienne tropicale.